

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-173362

(43) 公開日 平成9年(1997)7月8日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 F 2/10			A 6 1 F 2/10	
A 6 1 L 27/00			A 6 1 L 27/00	C

審査請求 未請求 請求項の数10 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平7-351527

(22) 出願日 平成7年(1995)12月25日

(71) 出願人 000138082

株式会社メニコン

愛知県名古屋市中区葵3丁目21番19号

(72) 発明者 杉山 章寿

愛知県春日井市高森台五丁目1番地10 株
式会社メニコン総合研究所内

(72) 発明者 森山 剛

愛知県春日井市高森台五丁目1番地10 株
式会社メニコン総合研究所内

(72) 発明者 濱野 京子

愛知県春日井市高森台五丁目1番地10 株
式会社メニコン総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外1名)

(54) 【発明の名称】 人工皮膚

(57) 【要約】

【課題】 早期にしかも良好に皮膚欠損組織を再建できかつ培養皮膚などに比べて安価に安定に流通および長期間保存のできる人工皮膚を提供する。

【解決手段】 哺乳動物皮膚由来の細胞を培養皮膚用基材に播種培養してえられた培養皮膚を凍結乾燥することの特徴とする人工皮膚およびその製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物皮膚由来の細胞を培養皮膚用基材に播種培養してえられた培養皮膚を凍結乾燥することを特徴とする人工皮膚の製造法。

【請求項2】 培養皮膚用基材がコラーゲン、キチン、キトサン、ゼラチン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸およびポリグリコール酸からなる群より選ばれた少なくとも1つの生体適合物質よりなる請求項1記載の製造法。

【請求項3】 培養皮膚用基材がゲル状、スポンジ状、薄膜状、不織布状または織布状である請求項1または2記載の製造法。

【請求項4】 培養皮膚用基材に貫通した孔が設けられた請求項1、2または3記載の製造法。

【請求項5】 コラーゲンがアテロコラーゲンである請求項2記載の製造法。

【請求項6】 哺乳動物皮膚由来の細胞を培養皮膚用基材に播種培養してえられた培養皮膚を凍結乾燥してなる人工皮膚。

【請求項7】 培養皮膚用基材がコラーゲン、キチン、キトサン、ゼラチンヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸およびポリグリコール酸からなる群より選ばれた少なくとも1つの生体適合物質よりなる請求項6記載の人工皮膚。

【請求項8】 培養皮膚用基材がゲル状、スポンジ状、薄膜状、不織布状または織布状である請求項6または7記載の人工皮膚。

【請求項9】 培養皮膚用基材に貫通した孔が設けられた請求項6、7または8記載の人工皮膚。

【請求項10】 コラーゲンがアテロコラーゲンである請求項7記載の人工皮膚。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は人工皮膚およびその製造法に関する。さらに詳しくは、熱傷、創傷、褥瘡または皮膚潰瘍などの皮膚欠損創において、広範囲でかつ真皮の深部に達する皮膚欠損に用いて、良性肉芽組織の形成を促進する。狭い範囲の皮膚欠損であれば、良性肉芽組織の形成と共に表皮を含む欠損組織の再建を促進する、または治療するための人工皮膚およびその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より熱傷や擦過傷または褥瘡など皮膚に創傷を負ったばあい、ガーゼや脱脂綿などに軟膏を併用した治療が行われてきた。これらは、細菌感染防止能が低く、かつ、浸出液を迅速に吸収するため創面を乾燥させてしまい、除去の際に新生表皮細胞を剥離し、痛みや出血を伴うことも多かった。また、ガーゼや脱脂綿の交換も頻繁に行なわねばならなかった。

【0003】こうした状況に鑑みて、近年、種々の創傷

被覆材が開発されてきている。

【0004】たとえば、合成被覆材、生体被覆材およびハイブリッド被覆材などがあげられる。前記合成被覆材としては、合成高分子からなり、フィルム、ハイドロゲルなどの形態のものがあるが、ポリウレタンなどからなるフィルムやハイドロコロイドドレッシングと呼ばれる創傷被覆材は閉塞性が高いために、患部に浸出液を貯留させ治癒を遅延させることがしばしばある。

【0005】またナイロンなどの不織布による創傷被覆材では、患部への密着が強く、交換の際に形成した肉芽組織や上皮が剥離する問題があった。シリコン膜+ナイロン繊維+コラーゲンからなるハイブリッド被覆材も開発されているが、患部への密着性が強すぎ、上皮化が阻害されるという問題がある。前記生体被覆材としては、凍結乾燥豚皮、コラーゲンを原料として用いた不織布またはスポンジ、キチンおよび／またはキトサンを不織布としたものがあるが、生体適合性は高く、合成被覆材より創傷治癒効果は認められるばあいがあるが、満足できるものではない。

【0006】これらの創傷被覆材は、材質特性により一長一短があり、またいずれも満足した治癒効果がえられていないのが現状である。

【0007】一方、これらの問題を解決するために、わずかな皮膚片から表皮細胞あるいは線維芽細胞を採取し、培養フラスコ中で大量培養する技術が開発され、これらの培養細胞を用いた種々の培養皮膚が開発されてきている。

【0008】ハワード・グリーン(H. Green)、ジェームズ・レインワルド(J. Rheinwald)らが開発した培養表皮シートは、切手大の皮膚を採取し、表皮細胞を培養フラスコ中で大量培養して表皮シートをうるものである(ハワード・グリーン(H. Green)、サイエンティフィック・アメリカン(SCIENTIFIC AMERICAN)、1991年11月号参照)。

【0009】さらに、スティーブン・ボイス(S. Boyce)ら(サージェリー(SURGERY)、103巻、632～641頁、1993年4月号参照)は、皮膚からえられる表皮細胞をフラスコ中で大量に培養し、コラーゲンにコンドロイチン-6-硫酸を少量添加してスポンジ状にした基材上に表皮細胞を重層化させた培養皮膚を開発した。

【0010】また、線維芽細胞をコラーゲン基材に組み込み、この上に表皮細胞を重層化させた培養皮膚が、特開平第4-332561号公報に記載されている。

【0011】このようにして培養された皮膚は自家培養皮膚および他家培養皮膚に分けられる。前記したように自家培養皮膚は一部に市販されているが、生着率が非常に悪いという報告がなされている(ローリング・ダブリュー・リウ(Loring W. Rue)など、ザ・

ジャーナル・オブ・トラウマ、35巻、No. 5、1993年5月号参照）。また、短期間の保存しかできないので、受注時生産となるため膨大なコストがかかってしまう。一方、他家培養皮膚は基本的には生着しないが、細胞から産生される種々の生理活性物質によって良性肉芽組織の形成を促進し、皮膚欠損が深部にいたらないばあいには表皮を含む皮膚の再建も可能である。また、大量生産も可能であるのでコストをある程度低減できる。しかしながら、このばあいでも長期に在庫できず、培養皮膚を凍結保存したり、播種する細胞を凍結保存して細胞の活性（生存）を確保しておく必要がある。凍結保存方法としてはプログラムフリーザーを用いて室温から -80°C 程度まで $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で凍結し、液体窒素中約 -196°C に漬けるか、または -150°C 程度の液体窒素気相中かまたは超低温冷凍庫 -80°C 以下にて保存することが好ましい。このような方法は煩雑で、これらの装置は非常に高価であり、また、このような方法であっても細胞の生存率は半年ほどで半減してしまう。さらに、培養皮膚の流通の段階においては、培養皮膚に組み込まれた細胞の活性（生存）を確保するために新鮮な培地中で適切な温度を保ち、早急に使用せねばならない。凍結したまま流通させるばあいは前記のような低温を保った状態で運搬し、使用前に凍結保存液を培地などで置きかえて細胞の活性を回復する必要がある。これらの結果、培養皮膚は大変高価なものになってしまう。そのため、簡便に利用でき、より安価な代替品または手法の開発が望まれていた。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】熱傷、創傷、褥瘡または皮膚潰瘍など皮膚欠損創に用いて、早期に良性肉芽組織を形成させるもしくは表皮を含む欠損組織の再建を促進するまたは治療するための人工皮膚を提供することを目的とする。さらに詳しくは、哺乳動物皮膚の細胞由来の生理活性物質により欠損組織を早期にしかも良好に再建し、しかも培養皮膚などに比べて安価にかつ安定に長期間保存できる人工皮膚を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】前記の目的は、コラーゲン、キチン、キトサン、ゼラチン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸およびポリグリコール酸などからなる培養皮膚用基材に哺乳動物皮膚由来の細胞を播種培養して培養皮膚を作製し、これを凍結真空乾燥することで、創傷被覆材より早期にしかも良好に皮膚欠損組織における良性肉芽組織を形成できあるいは皮膚を再建でき、かつ培養皮膚などに比べて非常に簡便に扱え、安価に安定に長期間保存のできる人工皮膚を提供することである。

【0014】したがって本発明は、哺乳動物皮膚由来の細胞を培養皮膚用基材に播種培養してえられた、培養皮膚を凍結乾燥することを特徴とする人工皮膚およびその製造法に関する。

【0015】本発明において好ましくは、培養皮膚用基材がコラーゲン、キチン、キトサン、ゼラチン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸およびポリグリコール酸からなる群より選ばれた少なくとも1つの生体適合物質よりなり、培養皮膚用基材がゲル状、スポンジ状、薄膜状、不織布状または織布状であり、培養皮膚用基材に貫通した孔が設けられ、コラーゲンとしては、アテロコラーゲンである。

【0016】

【実施例】本発明において、哺乳動物とはヒトを含むあらゆる哺乳動物を意味する。

【0017】本発明において、培養皮膚用基材として、コラーゲン、ゼラチン、キチン、キトサン、または、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのムコ多糖類またはポリグリコール酸などの生体適合物質を好ましく用いることができる。さらには、前記コラーゲンとしては、アテロコラーゲンが生体親和性の点で好ましい。

【0018】本発明に用いられるコラーゲンゲルは、コラーゲン溶液をプラスチックなどの容器に流し込み、熱をかけるかあるいはアンモニアガス雰囲気下などでゲル化させ平衡塩溶液などに置換することにより作製することができる。

【0019】前記コラーゲンゲルを作製するのに用いられるコラーゲン溶液は、ウシ真皮などからえられたコラーゲンから調製して、pHを好ましくは2~4、濃度が0.2~5w/v%、好ましくは0.5~2w/v%として、ゲル化はアンモニアなどのガス雰囲気下で必要に応じて数分~2時間行なう。ゲル化後、平衡塩溶液などに置換してコラーゲンゲルをうる。あるいは、コラーゲンの中性溶液（pH6.5~8）をゲル化させるばあい濃度0.1~1w/v%、好ましくは、0.2~0.5w/v%でアルカリ性ガスなどは用いずに35~40 $^{\circ}\text{C}$ に静置してゲルをうる。

【0020】ゲルが簡単に溶解しないようにこののち架橋するのが好ましい。架橋は、紫外線（UV）を照射することによるかまたは架橋剤を用いて行なう。紫外線を照射するばあい、架橋に用いる紫外線の主波長は250~270nmのものが好ましく、紫外線量は500~12000mWsec/cm²、好ましくは1000~5000mWsec/cm²を照射するとよい。本発明に用いられる架橋剤の例としてはたとえば、グルタルアルデヒド、ホルマリン、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリグリセロールポリグリシジルエーテル、グリセロールポリグリシジルエーテル、ヘキサメチレンジイソシアネートなどがあげられる。また、コラーゲンゲルの大きさは適用する創面の大きさにあわせて適宜選択される。また、コラーゲンゲルの厚さおよび形状は適用される創面の状態によって適宜選択すればよいが、厚さ0.3~30mm、形状は、薄板状、板状、棒状、紡錘状あ

るいは両側凸のレンズ状などに成形するとよい。

【0021】本発明に用いられるコラーゲンスポンジは、コラーゲン溶液をホモジナイザーを用いてホモジナイズすることにより充分に気泡を含ませたものを前記ゲル作製と同様の容器に流し込み、アンモニアガス雰囲気中に静置してゲル化させたのち凍結乾燥を行ない、ついで紫外線照射または架橋剤によって分子間架橋を導入することにより作製することができる。

【0022】前記コラーゲンスポンジ作製に用いられるコラーゲン溶液は、ウシ真皮などからえられたコラーゲンから調製して、pHを好ましくは2~4に調整し、濃度が0.2~5w/v%、好ましくは0.5~2w/v%とすることによりえられる。ゲル化は前記と同様に必要に応じて数分~2時間行ない、こののち、凍結乾燥を行なって架橋することで作製される。

【0023】架橋に用いる紫外線(UV)の主波長は250~270nmのものが好ましく、紫外線量は500~12000mWsec/cm²、好ましくは1000~5000mWsec/cm²の線量を照射するとよい。本発明に用いられる架橋剤の例としてはたとえば、グルタルアルデヒド、ホルマリン、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリグリセロールポリグリシジルエーテル、グリセロールポリグリシジルエーテル、ヘキサメチレンジイソシアネートなどがあげられる。また、コラーゲンスポンジの大きさは適用する創面の大きさにあわせて適宜選択される。また、コラーゲンスポンジの厚さおよび形状は適用される患部の状態によって変化するが、厚さ0.3~30mm、形状は、薄板状、板状、棒状、球状、紡錘状あるいは両側凸のレンズ状などに成形するとよい。

【0024】本発明に用いられるコラーゲン薄膜は、コラーゲン溶液を前記ゲルおよびスポンジ作製と同様の容器に入れ、乾燥機の中で風乾して薄膜を形成させたのち、紫外線照射または架橋剤によって分子間架橋を導入することにより作製することができる。また、通常用いられる湿式抄紙法などによりコラーゲン短繊維から不織布を作製してもよく、コラーゲン繊維を織って織布を作製してもよい。

【0025】前記コラーゲン薄膜作製に用いられるコラーゲン溶液は、ウシ真皮などからえられたコラーゲンから調製して、pHを好ましくは2~4に調整し、濃度が0.2~3w/v%、好ましくは0.5~2w/v%とすることによりえられる。

【0026】架橋に用いる紫外線(UV)の主波長は250~270nmのものが好ましく、紫外線量は500~12000mWsec/cm²、好ましくは1000~5000mWsec/cm²の線量を照射するとよい。本発明に用いられる架橋剤の例としてはたとえば、グルタルアルデヒド、ホルマリン、エチレングリコール

ジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリグリセロールポリグリシジルエーテル、グリセロールポリグリシジルエーテル、ヘキサメチレンジイソシアネートなどがあげられる。また、コラーゲン薄膜の大きさおよび厚さは適用する創面の大きさにあわせて適宜選択される。

【0027】本発明に用いられるコラーゲン不織布は、一般的な湿式抄紙法により作製される。すなわち、塩酸、酢酸などを用いてpHを1.5~4、好ましくは2~3に調整し、濃度を0.5~5w/v%、好ましくは1~3w/v%にしたコラーゲン水溶液(紡糸原液)を紡糸ノズルから濃厚塩溶液へ紡出することによりコラーゲン繊維をえる。紡糸ノズルは、0.1~0.4mm、好ましくは0.15~0.3mmの直径を有するものであってもよい。前記濃厚塩溶液は、20~26w/v%に調整された塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの水溶液であってよい。えられたコラーゲン繊維は室温にて風乾したのち、カッター、はさみなどの切断手段を用いて繊維を3~10mm、好ましくは4~8mmの長さの短繊維となるよう切断される。ついで、えられたコラーゲン短繊維を水に対して不溶性とするためにポリエポキシ化合物、アルデヒド化合物などにより架橋する。この方法は、たとえばつぎのようにして遂行できる。えられた短繊維を繊維に対して0.01~0.1w/v%のグルタルアルデヒド化合物などの10%程度の塩化ナトリウム水溶液あるいは硫酸ナトリウム水溶液などを分散媒として用いて1~3時間浸漬する。

【0028】こののち、充分に水洗し、蒸留水などに分散させ叩解処理して均一な分散液(スラリー)をうる。抄紙は、たとえばナイロン、ポリエステルなどの繊維、ステンレスなどの金属または樹脂から作製された50~100メッシュの篩上で手抄する。もしくは工業的には、前記短繊維の分散液を抄紙機にかけて抄紙する。えられる薄板状のものを脱水し、25~35℃でゆるやかに風乾するかまたは室温にて減圧乾燥することによりコラーゲン不織布がえられる。

【0029】さらに、強度を持たせるばあいには、コラーゲンまたはゼラチンの希薄な水溶液を不織布表面に噴霧し、架橋させる。たとえば、乾燥させた不織布にグルタルアルデヒド0.01v/v%を含む0.01~0.5w/v%コラーゲン水溶液を100mL/m²程度で噴霧して、風乾する。こののち水洗し、再度風乾させる。

【0030】本発明に用いられるコラーゲン織布は前記のようにしてえられたコラーゲン繊維を通常の方法で織ることにより作製される。

【0031】本発明で用いられるヒアルロン酸薄膜は、ヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解させ、こののち、水酸化ナトリウム水溶液を加え、これに架橋剤を加えて攪拌する。このヒアルロン酸ナトリウム水溶液をシ

ヤーレに流し込んで、60℃程度に加熱することでゲル状物をえた。これを0.1～1規定の塩酸などの酸性の水溶液に浸漬することで中和し、水洗したのち、凍結乾燥してヒアルロン酸薄膜をえた。

【0032】本発明で用いられるヒアルロン酸含有コラーゲンスポンジおよび薄膜は、以下のように作製される。すなわち、ヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解させ、このヒアルロン酸ナトリウム水溶液をコラーゲン水溶液に加え攪拌する。前記コラーゲン水溶液は、ウシ真皮などからえられたコラーゲンから調製して、pHを好ましくは3～4.5に調整し、濃度が0.2～5w/v%、好ましくは0.5～2w/v%とすることによりえられる。ヒアルロン酸の濃度は、0.01～0.2mg/mLが好ましい。このヒアルロン酸-コラーゲン混合液を用いて前記コラーゲンスポンジおよび薄膜の作製方法でヒアルロン酸含有コラーゲンスポンジおよび薄膜を作製する。

【0033】本発明で用いられる基材には、その少なくとも片面において哺乳動物皮膚の表皮細胞が播種され培養増殖されるのが好ましいが、哺乳動物皮膚の線維芽細胞であってもよい、当然表皮細胞と線維芽細胞の両方が播種培養されていてもよい。

【0034】基材がゲルのばあいには、これら細胞と中性コラーゲン溶液とを混合してゲル化する。前記表皮細胞とは、基底細胞を含む角質化細胞およびその他の表皮細胞層に通常存在する細胞を意味するが、ここでは主に角質化細胞をいう。前記線維芽細胞とは、主に真皮中の主要な細胞であり、コラーゲンをはじめとする結合組織成分を産生して、これらの成分と結合して結合組織を形成している細胞をいう。

【0035】前記表皮細胞は、一例として、以下の手順で調製される。清潔な環境下で採取された皮膚（表皮および、真皮の一部または皮膚全層）を消毒し、抗生物質を含有する生理食塩水またはハンクス（Hank's）液などの緩衝液に浸漬する。この皮膚をディスパーゼ濃度1000U/mLに調製したハンクス液（以下、「ディスパーゼ溶液」という。）に浸漬したのち表皮と真皮に分離する。えられた表皮をトリプシン濃度0.25w/v%、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA）濃度0.5mM/mLに調製したハンクス液（以下、「トリプシン溶液」という。）中、37℃で約15分間浸漬したのち10v/v%ウシ胎児血清（FCS）を含むダルベッコ変法イーグル最少必須培地（DMEM）（以下、「DMEM+10%FCS」という。）などの培地中に移し、振とうすることにより細胞を分散させ、約400×g、5分間、遠心分離にてうることができる。えられた表皮細胞は、たとえばグリーン（Green）培地、NCTC168培地、MCDB153培地、とくに好ましくはグリーン培地を加えて表皮細胞懸濁液とする。

【0036】前記グリーン培地とはDMEMとHam's F-12を3:1に混合し、ハイドロコルチゾン（0.4μg/mL）、インスリン（5μg/mL）、トランスフェリン（5μg/mL）、トリヨードチロニン（0.0013μg/mL）、コレラ毒素（0.01μg/mL）、アデニン（24.3μg/mL）、表皮増殖因子（0.01μg/mL）と抗生物質を添加し、10%FCSを含んでなる表皮細胞増殖培地である（セル（Cell）、40巻、677～683頁、1985年3月号参照）。

【0037】前記表皮細胞を高効率で増殖させるには、たとえばマイトマイシン処理や放射線照射などによって増殖能を消失させたマウス由来の線維芽細胞である3T3細胞などを支持細胞として定着させた培養フラスコ中で表皮培養を行なうことが好ましい。

【0038】具体的には、この3T3細胞を培養したのち、培地を除去してハンクス液ですすぎ、これを除去する。ついでマイトマイシン4μg/mL含有DMEM溶液を細胞全体が充分漬かるように75cm²フラスコでは、1～3mL加え37℃にて2時間程度静置したのちハンクス液で洗浄し、マイトマイシンCを除去する。こうして、3T3細胞は生きてままで増殖能のみが消失せしめられる。えられた増殖能を有しない3T3細胞を採取して、前記グリーン培地に懸濁し、 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ cells/cm²、好ましくは $5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ cells/cm²の密度になるよう調製したのち培養フラスコへ播種する。この培養フラスコに前記表皮細胞を3T3細胞と同時にまたは3T3細胞播種の1～2日後に $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ cells/cm²、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ cells/cm²の細胞密度にて播種して、5%CO₂インキュベーター中、37℃にて培養する。3T3細胞はこの培養継続中に表皮細胞がコロニーを形成する過程においてフラスコ底面より培地中に浮き上がり、培地を交換する際に除去されるので、最終的にえられる表皮細胞にはほとんど含まれない。

【0039】培養増殖させた表皮細胞は、ディスパーゼ溶液を加え37℃にて約2時間静置することにより剥がす。これをトリプシン溶液に加え表皮細胞を分散させたのち遠心分離して採取し、グリーン培地を添加して細胞懸濁液をえる。

【0040】表皮細胞は、必要に応じて継代培養する。具体的には、前記支持細胞を必要数量作製し、前記したように培養増殖した表皮細胞を採取して支持細胞に播種培養する。この際、表皮細胞が角質化しないように注意して継代培養する。

【0041】えられた表皮細胞を作製されたたとえば約6×9.5cm、厚さ2mmのコラーゲンスポンジ基材に $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ cells/cm²の細胞密度にて播種する。表皮細胞が基材に接着したのち、グリー

ン培地を加えて5%のCO₂インキュベーター中37℃にて3日ごとに培地を交換しながら1~20日間培養する。このようにしてコラーゲンスポンジ基材に表皮細胞が付着した培養表皮がえられる。

【0042】線維芽細胞は、採取された皮膚を前記と同様に表皮と真皮に分離したのち、えられた真皮をハサミ、ホモジナイザーなどを用いて碎き、0.5w/v%のコラゲナーゼDMEM溶液（以下、「コラゲナーゼ溶液」という）に加え、約6時間、約37℃にて振とうして結合組織を溶解させたうえで約400×g~約1,000×g、好ましくは約600×g~約800×gで遠心分離して採取する。えられた線維芽細胞は、DMEM+10%FCSなどを培地として5%CO₂インキュベーター中37℃にてサブコンフルエントとなるまで培養し、必要に応じて多くの線維芽細胞をうるように継代培養する。

【0043】こうしてえられた線維芽細胞をたとえば約6×9.5cm、厚さ2mmのコラーゲンスポンジ基材に播種するばあい、培養した線維芽細胞をトリプシン溶液を用いて剥がし、遠心分離して採取し、DMEM+10%FCS中で線維芽細胞懸濁液を調製する。この細胞懸濁液を $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、好ましくは $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度にてコラーゲン基材に播種する。細胞が基材に接着したのち、DMEM+10%FCSを加え、5%CO₂インキュベーター中37℃にて3日ごとに培地を交換しながら1~20日間培養を行なう。このようにしてコラーゲンスポンジに線維芽細胞が付着した培養真皮をうることができる。

【0044】また、表皮細胞および真皮細胞の両方を併せて有する複合培養皮膚は、以下のように作製される。前記した培養真皮の作製工程にて線維芽細胞を播種し3時間~3日程度培養したのち該基材を裏返し、培養表皮の作製における工程を行ない複合培養皮膚をうることができる。

【0045】本発明の人工皮膚の作製方法は以下のとおりである。こうして作製された培養表皮、培養真皮または複合培養皮膚である培養皮膚を-5℃以下、好ましくは-10℃以下で凍結する。凍結手段としては凍結乾燥機、冷凍庫、超低温冷凍庫、液化炭酸ガスなどを用いる。凍結された培養皮膚を-5℃~-85℃、好ましくは凍結させた温度で真空下にて乾燥を開始する。この際、真空度は、凍結温度における氷の水蒸気圧以下とする。乾燥の過程は、凍結せしめた培養皮膚の温度を測定することで観測する。凍結した培養皮膚を真空乾燥すると、氷結は昇華し蒸発潜熱が奪われるので、培養皮膚（人工皮膚）の（凍結）設定温度より低温であるが、昇華が完了した時点で設定温度と同程度となる。しかし、こののちわずかな水分が水蒸気の状態で人工皮膚中に残存するので昇華完了後さらに10~72時間真空下で乾

燥する。

【0046】乾燥が完了したのち5~20℃、好ましくは5~10℃で取り出し、20℃以下、好ましくは10℃以下にて保存する。培養皮膚作製において前記のように血清を含む培地を用いたばあいには、人工皮膚作製において凍結前に培養した培地を除去し、血清を含まないDMEMまたはMCDB153培地に置換したうえで凍結乾燥を行なうことが好ましい。

【0047】培養皮膚作製において、MCDB153培地などの無血清培地を用いたばあいには、そのまま凍結乾燥を行なうことができる。

【0048】本発明における培養皮膚用基材には、貫通した孔を設けることができる。前記孔は、とくに培養皮膚用基材に厚みがあるばあい（たとえば0.5mm以上）には設けられているのが好ましい。

【0049】本発明における培養皮膚用基材に用いられるヒアルロン酸は、創傷などを負ったばあいに初期の段階で細胞から出現する生体由来高分子であり、患部の治癒過程において細胞の足場をゆるやかにすることにより細胞を移動しやすくするという機能を果たしていると考えられている。ヒアルロン酸は、コラーゲン基材を作製する際に0.01~0.2mg/mLの濃度で用いられる。

【0050】また、細胞を基材に良好に接着させるために、細胞接着因子としてフィブロネクチンやラミニンなどを本発明の基材に被覆しておくとともに良好な培養皮膚がえられる。

【0051】本発明に用いられる培養皮膚は、移植用に作製され長期に培養された培養皮膚または凍結保存された培養皮膚が細胞生存率の低下により破棄することとなったものを利用することができる。このばあい、簡単に乾燥するだけで本発明の人工皮膚へ転換することができる。培養皮膚の有効利用が可能である。凍結保存された培養皮膚を当該人工皮膚に転換するばあい、凍結保護剤（グリセロール、DMSOなど）を除去したうえで人工皮膚を作製することが好ましい。

【0052】哺乳動物皮膚の細胞を用いて作製された培養皮膚より作製された人工皮膚は、以下のようにして創傷治癒に有効に働くと考えられる。

【0053】創傷の治癒過程は、血管の収縮による止血、血小板による血液凝固（血液凝固期）、白血球の遊走・食作用（炎症期）、線維芽細胞の増殖・コラーゲンの産生（増殖期）、組織の再構築（構築期）からなる4段階の連鎖反応である。

【0054】こうした創傷治癒過程には、様々な生理活性物質が関与している。

【0055】炎症期には、炎症反応によって浸潤する好中球、リンパ球、マクロファージが、種々の炎症性の生理活性物質を産出する。これらの炎症細胞の出現が引き金となって連鎖反応が起り生理活性物質が産生されるこ

とて線維芽細胞が増殖し、コラーゲンやフィブロネクチンなどが産出して細胞外基質が形成される。同時に血管内皮細胞の増殖が進み血管新生が促進され肉芽組織が再構築される。引き続き、表皮細胞が残存しているか、または狭い範囲の創傷であれば、これらの生理活性物質の作用により表皮細胞が増殖、移動して皮膚組織を再構築する。

【0056】ここで、生理活性物質とは、成長因子およびサイトカインのことである。成長因子とは、特異的なレセプターを介して細胞の増殖、分化を制御している物質であり、大部分はポリペプチドである。サイトカインとは、免疫応答、炎症反応など細胞間相互作用を媒介する糖タンパク質であり、マクロファージ、リンパ球、線維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞で産生される。

【0057】成長因子とサイトカインは、一般に厳密に区別して取り扱われていないのが現状であるので、ここでは総称してサイトカインと呼ぶ。

【0058】前記した創傷治癒過程とサイトカインの関係は、未だ不明な点が多いが、最近次第に解明されつつある。

【0059】具体的には、炎症期にマクロファージが、インターロイキン(IL)-1、IL-6、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、トランスフォーミング成長因子(TGF)- β 、線維芽細胞増殖因子(FGF)など多くの創傷治癒反応を促進するサイトカインを産生する。

【0060】続いて、線維芽細胞は、血小板由来増殖因子(PDGF)、表皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)などの作用を受け増殖する。線維芽細胞はIL-1、IL-6、インターフェロン(IFN)- β 、インスリン様成長因子(IGF)-Iなどを産生して、自己分泌(オートクライン)的な増殖も認められている。オートクラインとは、細胞が自ら成長因子をつくってその細胞自身に作用することを言う。

【0061】細胞外基質の形成にはTGF- α が重要な働きをしている。肉芽組織の形成には、血管新生が不可欠であり、FGF、血小板由来血管内皮細胞成長因子(PD-ECGF)が働いている。(徳永昭ら、創傷治癒とサイトカイン、バイオメディカル・パースペクティブ(Biomedical Perspective、4巻、No. 1、15~22頁、1995年参照)。

【0062】表皮のケラチノサイトからは、IL-1、IL-3、IL-6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、TGFが産出されており、そのメカニズムはほとんど解明されていないが、皮膚構成細胞に様々に作用し、毛包などに残存する表皮細胞または創周辺の表皮細胞の増殖、移動を促進して表皮を形成する。

【0063】小野らは、浅達性II度熱傷で生じた水疱中の浸出液に含まれる種々のサイトカイン(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TGF- α 、TGF

- β 1、TGF- β 2、PDGF、EGF、ベシックFGF(bFGF))の定量を行ない、同時に、浸出液が表皮細胞(ケラチノサイト)の増殖を促進することを確認している(バーズ(Burns)、21巻、No. 5、352~355頁、1995年参照)。

【0064】IL-6は、マクロファージのみならず、血管内皮細胞、線維芽細胞、表皮細胞から産出されている。これら外的な侵襲に際して、生体防御の最前線にある細胞がIL-6を産出することから、非特異的生体防御反応の早期にIL-6が働いていると考えられている。表皮細胞表面には、IL-6レセプターが存在することは明らかになっており、IL-6のオートクライン機構も考えられている(吉崎和幸、IL-6、サイトカイン94、74~81頁、1994年参照)。

【0065】哺乳動物皮膚からえられ、培養した線維芽細胞、表皮細胞の培養液には、種々のサイトカインが存在している。培養ケラチノサイトからは、正常な表皮に比し、多くのサイトカインを放出していると言われている。

【0066】これらの培養細胞を前記培養皮膚用基材に播種、培養した状態で、培養細胞から生理活性物質が分泌される。そして、この一部は培養細胞に付着し、一部は、培養皮膚用基材に沈着して留まり、また一部は培地中に拡散すると考えられる。

【0067】こうして作製した培養皮膚を凍結乾燥することで細胞は死滅するが、ポリペプチドや糖タンパク質である生理活性物質の一部は、人工皮膚中に温存される。

【0068】こうしてえられた人工皮膚を創面に適用することで創傷治癒を促進することができる。

【0069】

【実施例】以下に本発明を実施例をあげてさらに詳細に説明するが、本発明はもとよりこれら実施例に限定されるものではない。

【0070】実施例1

アテロコラーゲンゲルを基材とする培養皮膚を用いた人工皮膚の作製

清潔な環境下で採取されたヒトの正常皮膚片(約2×2cm、厚さ約0.5mm)をイソジン溶液(明治製菓(株)製)に浸漬し、ついでストレプトマイシン(1000 μ g/mL)、ペニシリン(1000U/mL)およびアンホテリシンB(2.5 μ g/mL)を混合したハンクス液に室温、30分間浸漬した。

【0071】つぎに、ディスパーゼ(合同酒精(株)製)溶液10mLに4℃にて12時間浸漬し、ピンセットを用いて表皮と真皮に分離し、えられた真皮部分をハサミでペースト状になるまで碎いたのち、コラゲナーゼ(和光純薬工業(株)製)溶液10mLで約6時間、37℃にて処理して結合組織を除去し、約700×g、5分間の遠心分離にて沈殿させることによって線維芽細胞

をえた。えられた線維芽細胞はDMEM（ライフテックオリエンタル社製）+10%FCSに懸濁してプラスチック製培養フラスコに播種し、5%CO₂インキュベーター中、37℃にて初代培養した。この線維芽細胞が増殖したのち、継代培養し、さらに増殖させた。

【0072】培養フラスコ中で増殖した線維芽細胞をトリプシン（ギブコ（GIBCO）社製）溶液を用いて剥がし、遠心分離してこれを採取し、DMEM+10%FCSに懸濁させた。

【0073】こうしてえた線維芽細胞を計数したのち、プラスチックケース（6×9.5cm、高さ2.8cm）にアテロコラーゲン溶液と線維芽細胞を混合して5×10⁴cells/cm²の細胞密度になるように混合して前記プラスチックケースに注加した。

【0074】ここで用いたアテロコラーゲン溶液は、0.2w/v%アテロコラーゲンDMEM溶液（pH7.4、アテロコラーゲンは（株）高研製）20mLである。

【0075】線維芽細胞を含んだアテロコラーゲン溶液は、5%CO₂インキュベーター中、37℃に静置することでゲル化した。5時間静置したのち、DMEM+10%FCSにて培地を置換し、5%CO₂インキュベーター中、37℃にて6日間、3日ごとに培地を交換しながら培養した。

【0076】培養後、この培養皮膚の培地をDMEMで置換し、過剰な培地を除去した。こののち、凍結乾燥機に入れ、-0.5℃/minにて-30℃まで凍結し、5時間後、真空度3×10⁻²mbarにて真空乾燥を開始し、品温（人工皮膚温度）が棚温（設定温度：-30℃）とほぼ同じになったのち棚温を5℃に上昇させ、さらに15時間乾燥し凍結乾燥機より取り出し、スポンジ状の本発明の人工皮膚をえた。この人工皮膚を5℃冷蔵庫で保存した。

【0077】実施例2

アテロコラーゲンスポンジを基材とする培養皮膚を用いた人工皮膚の作製

アテロコラーゲン（（株）高研製）を塩酸でpH3に調整した蒸留水100mLに1w/v%になるように加え、溶解させたのち、pH4に調整した。これをホモジナイザー（（株）日本精機製作所製）を用いて1分間攪拌することにより気泡を入れた。これをプラスチックケース（6×9.5cm、高さ2.8cm）に25mL注加し、アンモニアガス雰囲気中に2時間静置してゲル化させたのち、流水中にて水洗し、凍結乾燥を行なって厚さ2mmのアテロコラーゲンスポンジをえた。ついで、このスポンジの片面にUVを1mW/cm²、30分間照射したのちプラスチックケースに入れたままエチレンオキシドガス滅菌した。

【0078】えられたアテロコラーゲンスポンジにDMEM+10%FCSを加え24時間浸漬した。ついで余

分なDMEM+10%FCSを除去し、実施例1と同様にして採取、培養してえられた線維芽細胞を5×10⁴cells/cm²の細胞密度で播種し、5時間静置したのち、DMEM+10%FCSを加え、蓋をして5%CO₂インキュベーター中、37℃にて6日間で3日毎に培地を交換して6日間培養し、線維芽細胞を組み込んだ培養皮膚をえた。

【0079】この培養皮膚の1cm²を2片切り取り、実施例1に記載されたコラーゲナーゼ溶液に入れ、それぞれ溶解させ、基材のコラーゲンスポンジが溶解したのち、トリパンブルー色素排除法にて生細胞数を計測した。生細胞数は1.3×10⁵cells/cm²であった。

【0080】こののち実施例1の条件と同様に凍結乾燥し、本発明の人工皮膚をえた。この人工皮膚を冷蔵庫で5℃にて保存した。

【0081】実施例3

アテロコラーゲンスポンジを基材とする複合培養皮膚を用いた人工皮膚の作製表皮細胞は、バイオプシーでえられたヒトの皮膚（約2×2cm、厚さ約0.5mm）から実施例1に記載したと同様に分離した表皮を、実施例1に記載されたトリプシン溶液10mLで15分間、37℃にて処理したのちDMEM+10%FCS中に移し、振とうすることにより細胞を分散させ、400×g、5分間の遠心分離にて沈殿させることによってこれを集め、前記組成よりなるグリーン培地に懸濁した。

【0082】表皮細胞を高効率で増殖させるために、以下の支持細胞を用いた。マウス由来線維芽細胞である3T3細胞をDMEM+10%FCSに懸濁させ、これを培養フラスコ中に播種し、サブコンフルエントとなるまで5%CO₂インキュベーター中、37℃にて培養した。ついで、培地を除去してハンクス液ですすぎ、DMEMを加えてここに最終濃度が0.0004%になるようにマイトマイシンC（和光純薬工業（株）製）含有生理的食塩水溶液（0.1mg/mL）を添加した。この培養フラスコを37℃で2時間静置したのち、ハンクス液を用いて洗浄してマイトマイシンCを除き、増殖能が停止した3T3細胞を採取した。えられた細胞は、グリーン培地に懸濁し、計数後2×10⁴cells/cm²の密度となるように調製して培養フラスコに播種した。このようにして調製した3T3細胞を播種して20時間後に、前記表皮細胞を前記3T3細胞上に播種し、37℃にて5%のCO₂インキュベーター中で培養増殖させた。

【0083】一方、実施例2と同様にしてアテロコラーゲンスポンジに線維芽細胞を播種し、DMEM+10%FCS中で2日間培養し、線維芽細胞が付着した培養皮膚を作製した。

【0084】つぎに前記培養皮膚が入ったプラスチックケース中の培地を除去し、線維芽細胞が付着した培養皮

膚をケース中で反転させ、前記のように培養増殖させた表皮細胞を $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で播種した。ここで用いた表皮細胞は、前記したようにして培養増殖させたものを、実施例1に記載されたディスペーゼ溶液を培養フラスコに加えて 37°C で1時間静置することにより剥がし、これを遠心分離して、採取したのち実施例1に記載されたトリプシン溶液を加えて分散させ、再び遠心分離してこれを採取した。こうしてえられた表皮細胞にグリーン培地を加え、計数後、前記のように線維芽細胞を付着させた培養皮膚に播種したものである。

【0085】表皮細胞の播種後、クリーンベンチの中で8時間静置したのち、グリーン培地を加えて5%の CO_2 インキュベーター中で 37°C にて3日毎に培地を交換しながら10日間培養し、複合培養皮膚をえた。

【0086】えられた複合培養皮膚の入ったケースの培地を除去し、前記培養皮膚をDMEMで洗浄し、過剰なDMEMを除去したのち $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ にて -80°C まで凍結した。1カ月後、これを凍結の状態で真空乾燥した。この際の凍結乾燥条件は、 -30°C 、 $2 \times 10^{-2} \text{ mbar}$ であり、品温（人工皮膚温度）が棚温（設定温度： -30°C ）とほぼ同じになってから棚温 5°C として15時間真空乾燥し、本発明の人工皮膚をえた。

【0087】実施例4

ヒアルロン酸含有コラーゲンスポンジを基材とする培養皮膚を用いた人工皮膚の作製
塩酸でpH3に調整した蒸留水100mLにアテロコラーゲン（（株）高研製）を溶解して1w/v%の水溶液とした。こののち、アテロコラーゲン水溶液をpH4に調整した。また、別にヒアルロン酸ナトリウム（紀文フードケミファ（株）製）0.01gを蒸留水に溶かして1w/v%の水溶液を調製した。この溶液1mLを前記アテロコラーゲン水溶液と混合して100mLとし、ヒアルロン酸-アテロコラーゲン水溶液（ヒアルロン酸0.01w/v%溶液）をえた。これを1分間ホモジナイズしたのち、プラスチックケース（ $6 \times 9.5 \text{ cm}$ 、高さ2.8cm）にヒアルロン酸-アテロコラーゲン水溶液25mLを流し込んだ。これをアンモニア雰囲気下にて2時間静置してゲル化させ、水洗したのち、凍結乾燥を行なった。

【0088】これに1mW/cm²でUVを30分間照射したのち、エチレンオキサイドガス滅菌を行なってヒアルロン酸を含有したアテロコラーゲン基材をえた。

【0089】この基材に実施例2と同様の方法で採取し、増殖せしめた線維芽細胞を $5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で播種し、培養増殖させた。

【0090】こののち、培地を除去し、この培養皮膚をDMEMで洗浄し、余分なDMEMを除去した。こののち、凍結乾燥機に入れ約 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ にて -30°C まで冷凍して凍結させた5時間後、真空度 $2 \times 10^{-2} \text{ mb}$

arにて真空乾燥を開始し、品温（人工皮膚温度）が棚温（設定温度： -30°C ）とほぼ同じになってから棚温を 5°C として15時間真空下で乾燥したのち、凍結乾燥機から取り出し本発明の人工皮膚をえた。この人工皮膚を冷蔵庫で 5°C にて保存した。

【0091】実施例5

ヒアルロン酸薄膜を基材とする培養皮膚を用いた人工皮膚の作製

ヒアルロン酸ナトリウム0.2gに蒸留水1mLを加え、これに1N水酸化ナトリウム水溶液0.5mLを加えて溶解させ、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液とした。グリセロールポリグリシジルエーテル（デナコール EX-313メディカルグレード、ナガセ化成工業（株）製）2gをエタノール5mLに溶解させた。グリセロールポリグリシジルエーテルのエタノール溶液0.43gをヒアルロン酸ナトリウム水溶液に加えてよく攪拌した。この混合液を直径約2cmのプラスチックシャーレに入れ乾燥機で 60°C 、15分間加熱した。

【0092】えられた薄膜をこのシャーレからはずして蒸留水で水洗したのち、0.1N塩酸にて中和し、50v/v%エタノール水溶液に置換してまた蒸留水中に浸漬した。そののち、実施例2と同様に、線維芽細胞を播種し培養増殖させ、凍結乾燥して本発明の人工皮膚をえた。

【0093】試験例1

本発明の人工皮膚に温存された生理活性物質は、創面において浸出液に溶解または拡散し前記したような機構で創傷治癒を促進すると考えられる。人工皮膚にて創傷治癒が促進されることを動物実験にて確認した。

【0094】4週齢のオスICRマウス（4匹）を飼育室で2週潤化させてから以下の実験に供した。マウスを左手でしっかり保持したのち、生理的食塩水で5倍に希釈したペントバルビタール（ビボット社）を50mg/kgの濃度で腹腔内に投与し、深麻酔に至ってから背部中央の3cm四方を剃毛した。翌日、マウスに前日と同様の麻酔を施し、深麻酔に至ったマウスをコルク板上に固定した。70%アルコールで背部正中皮膚を消毒したのち、左右2カ所の皮膚剥離位置にそれぞれ直径20mmの皮膚切離マークを施した。円形マークの頭側の円周上の一点をピンセットでつまみ上げ、マークの内縁に沿って眼科用ハサミで約2mmを切り、ここを拠点として皮切を伸ばして行き、出血および皮下筋層の切断なしに直径20mmの移植床を2カ所作製した（図1）。

【0095】実施例2で作製したスポンジ状の人工皮膚を6ヶ月間 5°C にて保存したのち、直径20mmに切り、DMEMに浸漬後、室温に30分間放置し、十分にDMEMになじませてから、人工皮膚より大きな滅菌ガーゼで覆った。このとき、人工皮膚と滅菌ガーゼを密着させたまま、移植床の中央に置き、人工皮膚を移植床面に隙間が残らないように広げた。

【0096】このようにして、移植床と人工皮膚の辺縁を合わせたのち、周辺の6ヶ所を6-0ナイロン糸付角型縫合針（協和時計工業（株）製）で縫合した。

【0097】人工皮膚の上に、直径20mmの円形に作製した創傷被覆用不織膜を載せ、人工皮膚と同様に6カ所を縫合し、さらに25mm四方に折りたたんだ滅菌ガーゼ2〜3枚を載せ、弾性包帯を胸腹部に巻き固定した。

【0098】同時に、実施例2の前半で作製方法を開示したコラーゲンスポンジを対照として人工皮膚の代わりにも同一マウスに使用し、同様の処置をした。移植後は、隔離式のケージを用い一匹毎に飼育した。

【0099】移植した人工皮膚の観察および2次移植は、一週間ごとに4週間行なった。観察を行なう時には、前記同様、麻酔を施し、包帯を除去したのち、眼科用ハサミで抜糸し、移植した人工皮膚を取り除いた。創面を肉眼的に観察したのち、前述同様に人工皮膚を移植し（2次移植）さらに実験終了まで毎週同様の操作を繰り返した。

【0100】観察全期間を通して、創面の壊死、硬結、浮腫などの所見を伴う拒絶反応は出現しなかった。移植後1週間では、人工皮膚移植面（図2右創面）は、創全面に良性肉芽組織が形成しているのが観察できたが、コラーゲンスポンジのみを適用した創面（図2左創面）では、肉芽の発達が良くなく、若干の感染と若干の皮膚拘縮が見られた。2週間後には、人工皮膚移植面（図3右創面）は、さらに肉芽が発達し、周囲からの表皮の伸展が明らかとなっているのに対して、コラーゲンスポンジのみを適用した創面（図3左創面）は、肉芽組織の形成および表皮の伸展共に人工皮膚を貼付したものほどではなかった。4週間後には、人工皮膚を移植した創面（図4右創面）は、コラーゲンスポンジのみを適用した創面（図4左創面）に比し、表皮の閉塞が早く、かつ、拘縮もみられず良好に治癒していた。

【0101】試験例2

IL-6の定量

本発明の人工皮膚中に温存されたIL-6タンパク質量は、固相上に固定化した抗体により、測定すべきIL-6タンパク質をトラップし、酵素標識二次抗体を使ってトラップされたIL-6タンパク質の定量を行なう、サンドイッチ型酵素免疫測定法（ELISA法）で行なった。

【0102】実施例2で作製した人工皮膚および対照として実施例2前半で作製したコラーゲンスポンジを20mm四方に切り、あらかじめ眼科用ハサミで細断し、10倍容量のDMEM+10%FCSとともにプラスチック製チューブ（住友ベークライト（株）製）に入れ、ポリトロン型ホモジナイザー（キネマチカ（Kinematica）社製）を用いて1000rpmで5〜10回上下させながら、30秒間破壊し測定試料を調製した。

そののち、孔径0.22 μ mのメンブレンフィルターを通過させることにより試料中の残骸（デブリ）を取り除いてから、IL-6タンパク質の定量に供した。

【0103】固相としてポリスチレン製のマイクロタイタープレート（日本インターメッド（株）製）を使用した。抗IL-6抗体（カベル社）を0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0で20 μ g/mLの濃度に溶解し、えられた溶液中に前記プレートを4℃で一夜漬けて、抗IL-6抗体を固相へ物理的吸着により固定化した。

【0104】前記プレートを0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0で洗浄したのち、同じ緩衝液で3〜300pg/mLの濃度に希釈した測定試料およびIL-6標準物質と抗IL-6抗体が固定化されたマイクロタイタープレートを37℃で振とうしながら、1時間インキュベートした。0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0で洗浄後、測定すべきIL-6タンパク質のトラップされたマイクロタイタープレートと二次抗体である抗IL-6タンパク質抗体（カベル社）とを37℃で1時間インキュベートした。こののち、前記の緩衝液で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体を加えさらに37℃で1時間インキュベートし、前記緩衝液で洗浄後、ペルオキシダーゼの基質であるABTS（2,2'-アゾノジ（3-エチルベンズチアゾリン）-6'-スルホン酸）（シグマ社）および過酸化水素を用いた発色法により、ペルオキシダーゼ活性を定量し、マイクロタイタープレート中のIL-6タンパク質量を算出した。

【0105】測定試料の一部を用いて、牛血清アルブミンを標準にしたビシンコニン酸法によるタンパク質量を行ない、マイクロタイタープレート各穴毎のタンパク質量を求めた。最終的な指標として、各マイクロタイタープレート穴毎に、全タンパク質量に対するIL-6タンパク質量を計算し、これを人工皮膚中のIL-6タンパク質量とした。

【0106】この結果、測定試料中の全タンパク質量あたりのIL-6タンパク質量が人工皮膚と培養皮膚に含有されていることが認められた。

【0107】すなわち、本発明の人工皮膚からは、全タンパク質1mgあたり平均190pgのIL-6タンパク質が検出できた。

【0108】対照として用いたコラーゲンスポンジからは、IL-6タンパク質は検出されなかった。

【0109】

【発明の効果】本発明によれば、哺乳動物皮膚由来の細胞を培養皮膚用基材に播種培養してえられる培養皮膚を凍結乾燥することによって、従来の創傷被覆材より早期にしかも良好に皮膚欠損組織を再建できかつ培養皮膚などに比べて安価かつ安定に流通でき、長期間保存できる人工皮膚を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】全層欠損創（aおよびb）を作製したマウスの創面をスケッチした図である。図1中、cおよびdは全層欠損創（aおよびb）の作製時に切り取った皮膚片である。

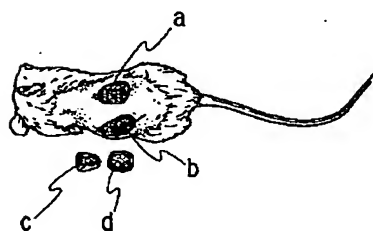
【図2】人工皮膚移植1週間後のマウスの創面をスケッチした図である。右背部（a）は本発明の人工皮膚を適用した創面であり、左背部（b）は対照のコラーゲンスポンジを適用した創面である。図2中、cは創面（a）に適用した人工皮膚であり、dは創面（b）に適用したコラーゲンスポンジである。

【図3】移植後2週間後のマウスの創面をスケッチした

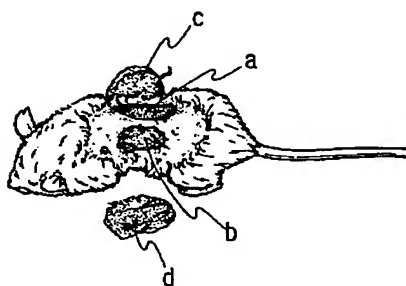
図である。右背部（a）は本発明の人工皮膚を適用した創面であり、左背部（b）は対照のコラーゲンスポンジを適用した創面である。図3中、cは創面（a）に適用した人工皮膚であり、dは創面（b）に適用したコラーゲンスポンジである。

【図4】移植後4週間のマウスの創面をスケッチした図である。右背部（a）は本発明の人工皮膚を適用した創面であり、左背部（b）は対照のコラーゲンスポンジを適用した創面である。図4中、cは創面（a）に適用した人工皮膚であり、dは創面（b）に適用したコラーゲンスポンジである。

【図1】



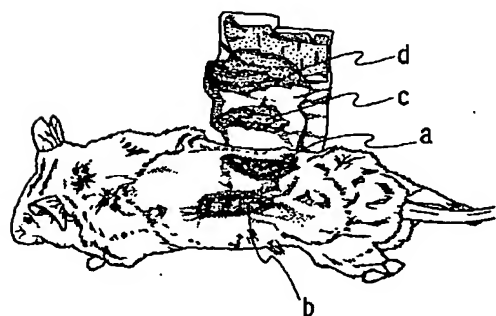
【図2】



【図4】



【図3】



ARTIFICIAL SKIN

Patent number: JP9173362
Publication date: 1997-07-08
Inventor: SUGIYAMA AKIHISA; MORIYAMA TAKESHI; HAMANO KYOKO
Applicant: MENICON CO LTD
Classification:
- **international:** A61F2/10; A61L27/00
- **european:**
Application number: JP19950351527 19951225
Priority number(s):

AC

Report a data error here**Abstract of JP9173362**

PROBLEM TO BE SOLVED: To make it possible to form benign granulation tissues in an early period and to promote the reconstruction of the deficient tissues by freeze drying the cultured skin obtd. by seeding and culturing the cells derived from the mammal skin to a base material for the cultured skin.

SOLUTION: The cultured skin obtd. by seeding and culturing the cells derived from the mammal skin to the base material for the cultured skin is freeze dried. The base material for the cultured skin is formed of the bioadaptable materials selected from a group consisting of collagen, chitin, chitosan, gelatin, hyaluronic acid, chondroitin sulfuric acid and polyglycolic acid. Further, the base material for the cultured skin is formed to a gelatinous, spongy, thin film-like, non-woven fabric-like or woven fabric-like form. The base material for the cultured skin is provided with holes penetrating the material and the collagen is formed as atherocollagen. As a result, the early and good reconstruction of the deficient tissues of the skin is made possible. The artificial skin which may be more inexpensively and stably distributed than the cultured skin, etc., and may be preserved over a long period of time is obtd.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan